

THESIS

MARBURG

1965

Aus der Universitäts-Kinderklinik in Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. F. Linneweh

Untersuchungen über den Einfluß von Methotrexat auf immunologische Reaktionen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Brigitte Bachmann

aus Wesel/Rhein

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Aus der Universitäts-Kinderklinik in Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. F. Linneweh

**Untersuchungen
über den Einfluß von Methotrexat
auf immunologische Reaktionen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Brigitte Bachmann

aus Wesel/Rhein

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 26.2.1965

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. H. Hensel

Referent: Prof. Dr. med. J. Oehme

Correferent: Prof. Dr. med. G.A. Martini

Meiner Mutter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Gliederung

A) Einleitung

I) Immunitätsfragen (S. 3 - 7)

- 1) Historisches (S. 3)
- 2) Antigen (S. 3 - 4)
- 3) Adjuvans (S. 4 - 5)
- 4) Antikörper (S. 5 - 7)

II) Reduzierte immunologische Aktivität (S. 7-22)

- 1) Immuntoleranz (S. 7)
- 2) Immunparalyse (S. 7)
- 3) Cortison (S. 8)
- 4) Röntgenstrahlen (S. 8 - 9)
- 5) Cytostatica (S. 9 - 12)
- 6) Antimetaboliten (S. 12 - 24)
 - a) Pyrimidin - Antagonisten (S. 12)
 - b) Purin - Antagonisten (S. 13)
 - c) Antagonisten des Nukleinsäure =
stoffwechsels (S. 13 - 24)
 - 1) 6 - Merkapto - Purin (S. 13 -17)
 - 2) Methotrexat (S. 17 - 24)
 - a) Seine Bedeutung als Cytosta =
ticum (S. 18 - 19)
 - b) Biochemie (S. 19 - 21)
 - c) Sein Einfluß auf die Anti =
körperproduktion (S. 21 --24)

III) Eigene Fragestellung (S. 25)

B) Eigene Untersuchungen (S. 25 - 58)

I) Einfluß von Methotrexat auf Immunreaktionen

(S. 25 - 51)

1) Material und Methoden (S. 25 - 31)

2) Vorversuche zur Dosierung des Methotrexats
mit Ergebnissen (S. 31 - 35)

3) Primär - Reaktion mit Ergebnissen
(S. 35 - 44)

4) Sekundär - Reaktion mit Ergebnissen
(S. 44 - 51)

II) Diskussion der Ergebnisse (S. 52 - 58)

1) Einfluß des Methotrexats auf Blutbild,
Gewicht und Körperhaare (S. 52 - 54)

2) Blockierte Antikörperbildung bei der
Primär - Reaktion (S. 54 - 56)

3) Reduzierte Antikörperbildung bei der
Sekundär - Reaktion (S. 56)

C) Zusammenfassung (S. 59 - 60)

A) Einleitung

I) Immunitätsfragen

1) Historisches

Grundlegende Beobachtungen über den Mechanismus erworbener Abwehrreaktionen (mikrobiologisch, tierexperimentell und zellphysiologisch) verdanken wir Pasteur, Koch und Metchnikoff, die tragfähigsten Erkenntnisse Ehrlich und v. Behring. Diese Untersuchungen führten zur Entdeckung hochspezifischer Abwehrstoffe, die im Anschluß an Infektionen oder Intoxikationen im Blut und Gewebe erscheinen. Der eigentliche Chemismus immunologischer Zustände blieb aber unbekannt.

2) Antigen

Von den Antigenen, die eine Bildung von Antikörpern auslösen, unterscheidet man makromolekulare Naturstoffe, Mikroorganismen, besonders konstituierte Kohlenhydrat - oder Lipoid - Verbindungen, die nur dann antigen wirksam werden, wenn sie parenteral in das Körperinnere gelangen, und artfremde Proteine. Die spezifitätsbestimmenden Molekülgruppen sind gewisse Peptidgruppierungen. Außer der Individualspezifität zeigen Proteine zusätzlich Artspezifität, die auf charakteristischen Unterschieden der Endgruppen einer Peptidkette beruht. Neue Befunde weisen darauf hin, daß die chemische Ursache

der Artspezifität außerdem in der unterschiedlichen Anordnung der Aminosäuren in den Polypeptidketten und in der Kettenlänge zu suchen ist.

Aber nicht nur diese " Vollantigene"; sondern auch deren höhere Spaltprodukte oder ihnen strukturverwandte Stoffe sind zur Antikörperbildung befähigt, und zwar bilden sie Antikörper gegen chemisch verwandte Makromoleküle, vermögen jedoch nicht zu immunisieren. Man bezeichnet sie deshalb als " Halbantigene". Deren niedere Bausteine, die Haptene, sind die kleinsten Einheiten des die Spezifität bedingenden Molekülbezirkes eines Antigenmoleküls. Außer den exogenen Antigenen finden die infolge pathologischer Vorgänge entstehenden endogenen Antigene eine zunehmende Bedeutung. Man unterscheidet Heteroantigene exogenen Ursprungs, Isoantigene, die von Individuen derselben Art stammen und Autoantigene endogener Herkunft. Ferner können im allgemeinen intakte Gewebszellen auch bei Empfängern der gleichen Art als Antigene reagieren, wie zum Beispiel die Blutzellen. Hier wird die nahe verwandtschaftliche Beziehung zwischen Gen und Antigen deutlich.

3) Adjuvans

Einen stimulierenden Einfluß auf die Antikörperbildung haben die sogenannten Adjuvantien. Bei ihnen handelt es sich um schwer resorbierbare Stoffe oder Stoffgemische

verschiedenster chemischer Zusammensetzung. Substanzen, welche hierfür infrage kommen, sind beispielsweise Nukleinsäure, Kalialaun und Aluminiumphosphat. Freund schlug eine Mineralölemulsion zusammen mit abgetöteten Mykobakterien als Adjuvans vor. S. Schmidt führte das Willstättersche Aluminiumhydroxydgel für die Adsorption gereinigter Antigene ein. (56, 57) Die Ursache ihrer Wirkung ist noch nicht ganz geklärt. Zunächst war man der Auffassung, daß die micellare Vergrößerung, welche Antigene durch lösliche oder unlösliche Trägersubstanzen erfahren, eine verstärkte Stimulierung der Antikörperproduktion bewirkt. Nachdem sich aber gezeigt hat, daß auch bei getrennter Injektion von Antigen und Adjuvans eine verstärkte Antikörperbildung einsetzt, ist der durch die antigenfreien Agentien bewirkten Leuko- und Phagocytose eine besondere Beachtung bei der Antikörperbildung zu zollen.

4) Antikörper

Das Produkt der Antigeneinwirkung auf bestimmte Zellen (Plasmazellen, Lymphocyten und Zellen des R E S) ist der Antikörper. Der Transport der Antigene an ihren Bestimmungsort erfolgt durch die Makrophagen, auch die Eosinophilen. (54). Man kann dem Antikörper eine weitgehend stoffliche Einheitlichkeit zuschreiben. Die

chemische Analyse ergibt Übereinstimmung mit den Gamma - Globulinen, deren Synthese unter der Einwirkung des Antigens eine mit chemischen Methoden bisher noch nicht nachweisbare Abwandlung erfährt. Das Ergebnis dieser Modifikation ist die Entstehung bestimmter Gamma - Globulintypen mit immunologischer Spezifität. Die tragfähigsten Theorien der Antikörperbildung stammen von Haurowitz (30, 31) und Pauling (50).

Beide gehen davon aus, daß die Antigene in die zweite Phase der Proteinsynthese eingreifen, indem sie eine Faltung der Ketten bewirken, die zu den determinierenden Gruppen des Antigens komplementär sind. Gegen diese Vorstellung erhoben sich Burnet und Fenner (10). Sie stellten eine " Fermenttheorie der Antikörpersynthese" auf und vertraten darin die Auffassung, daß die Antigene als Matrize für die Synthese spezifisch adaptierter Enzyme dienen, die durch Teilung auch nach Verschwinden aller Antigenreste noch Antikörper zu bilden vermögen. Die erworbene Spezifität der Antikörper äußert sich in einer starken Affinität zu den jeweiligen Antigenen. Das Ergebnis ist eine Bindungsreaktion zwischen Antigen und Antikörper bzw. den determinierenden Antigengruppen und den komplementären Strukturen des Antikörpers, wobei der spezifische Reaktionsort im Antikörpermolekül nur 1% seiner Oberfläche ausmacht. Die Bindungsreaktion

kann sich verschieden äußern, zum Beispiel in einer Präzipitation, Agglutination, Komplementbindung oder Lyse. Sie ist Voraussetzung für eine Unschädlichmachung von Krankheitserregern oder Toxinen, aber auch Ursache für Reiz- und Schockreaktionen, für Transfusionszwischenfälle und zahlreiche Organkrankheiten.

II) Reduzierte immunologische Aktivität

1) Immuntoleranz

Eine fehlende oder reduzierte Aktivität gegenüber einem Antigen tritt auf, wenn ein Organismus zu einem frühen Zeitpunkt, d.h. in der Fetalperiode oder unter gewissen Umständen auch noch später einem Antigen exponiert worden ist. Dieser Zustand wird nach Woodruff mit " Spezifischer immunologischer Toleranz " bezeichnet (81). Oehme schlug dafür die Bezeichnung " Antigentoleranz " vor, da das Antigen, ohne eine Antikörperbildung auszulösen, toleriert wird (46).

2) Immunparalyse

Zu den Phänomenen der Antigentoleranz gehört, wahrscheinlich als spezifischer Effekt, die von Felton beschriebene " Immunologische Paralyse ". Mit sehr hohen Dosen von Pneumokokkenpolysacchariden infizierte Mäuse reagierten weder auf diesen Antigenreiz noch auf spätere Injektionen des gleichen Antigens (17). Kaplan, Coons

und Deane nehmen an, daß die dauernd neu gebildeten Antikörper durch das noch im Organismus vorhandene Antigen abgefangen werden (37).

3) Cortison

Auch Cortison und Cortisonderivate haben einen hemmenden Einfluß auf die Antikörperproduktion. Seine Wirkung beruht auf der Erzeugung einer Lymphopenie sowie darauf, daß es die Mobilisation der Eosinophilen unterbindet, und diese, wie schon erwähnt, an der Phagocytose des Antigens stark beteiligt sind (54). Woodruff gelang bei Ratten die Verlängerung der Periode, während der die Erzeugung einer "Antigentoleranz" möglich ist, auf mindestens zwei Wochen nach der Geburt durch tägliche Injektionen sehr hoher Cortisondosen (80).

4) Röntgenstrahlen

Ebenfalls reduzierend auf die Stärke der Antikörperbildung wirken ionisierende Strahlen, wobei besonders die induktive Phase der Antikörperbildung strahlenempfindlich ist, im Gegensatz zur nachfolgenden Produktionsphase (5).

Läßt man zum Beispiel Röntgenstrahlen unter 50 r vor allem lokal auf lymphoretikuläres Gewebe einwirken, so erfolgt nach vorübergehender Schädigung eine gesteigerte Antikörperbildung, desgleichen bei Ganzkörperbestrahlung

mit kleinen Dosen. Bei Steigerung der Ganzkörperdosis über 100 r kommt es jedoch zunehmend zu einer irreversiblen Schädigung der zellulären und humoralen Abwehrfunktionen, sodaß der Organismus schutzlos dem Antigen ausgesetzt ist. Diese von Taliaferro bei Kaninchen festgesetzten Dosen (68, 69) konnten von Stender und Mitarbeitern bei Ratten bestätigt werden (65).

5) Cytostatica

Auch Cytostatica haben einen hemmenden Einfluß auf die Antikörpersynthese. So weiß man zum Beispiel von Endoxan, einem N,N' - Bis- (8-chloräthyl) -N'-O-propylenphosphorsäureesterdiamid, welches als Mitosegift zur Rückbildung von Tumoren, auch von Metastasen, in der Klinik Anwendung findet, daß es in das Immunitätsgeschehen eingreift. Endoxan erwies sich auch bei Mäusen als wirksam, die gegen Folsäure- und Purin- Antagonisten resistent waren (76, 77). Bei in-vitro-Bedingungen ist Endoxan inaktiv, da es hier wahrscheinlich in einer unwirksamen " Transportform " vorliegt, aus der die eigentliche Wirkform erst im Organismus, möglicherweise durch fermentative Ringspaltung entsteht (4). Eine immunologische Blockade erfolgt unter Endoxan wahrscheinlich über eine Depression des Nukleinsäurestoffwechsels bei der Bildung von Antikörpern. Diese Annahme geht aus einer Arbeit von Maguire hervor (40), Maguire und Mitarbeiter gaben einer Gruppe

von Meerschweinchen zwei Tage lang 15 mg Endoxan, dann 6 Tage 10 mg täglich. Einem Teil der Tiere spritzte man am 1. Tag der cytostatischen Therapie 10 mg Ovalbumin intraperitoneal, einem anderen Teil die gleiche Dosis am 2. Tag. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Ovalbuminmenge, jedoch kein Endoxan. 21 Tage später wurde eine Anaphylaxie - erzeugende Dosis von 2 mg Ei - Albumin intracardial injiziert, die zum sofortigen Tod im anaphylaktischen Schock führte. Danach hemmt die **vorherige** Verabfolgung von Endoxan die Bildung der anaphylaktischen Antikörper. Die Versuchstiere überlebten im Gegensatz zu der Kontrollgruppe.

Stender (65) verglich den Einfluß von Röntgenstrahlen und Endoxan auf die Antikörperbildung. Als Versuchstier wurde die Ratte, als Antigen eine Aufschwemmung abgetöteter *Brucella melitensis* verwendet. Es zeigte sich, daß Endoxan die Antikörperbildung schon in wesentlich niedrigeren Dosen hemmt, als ionisierende Strahlen. Eine Konzentration von 100 mg/kg Endoxan rief eine annähernd gleich starke Beeinträchtigung der Antikörperbildung hervor, wie 400 r einer 200 kv-Strahlung. Im Gegensatz zu den Strahlen führte Endoxan sowohl bei Verabfolgung **v o r** als **n a c h** der Antigengabe zu einer fast gleich großen Hemmung der Antikörperproduktion. Im histologischen Bild von Lymphknoten und Milz ist bei

cytostatischer Therapie vor und nach Antigengabe eine Verminderung der Plasmazellen gleichermaßen nachzuweisen. Auffallend ist der schnelle Eintritt der Agglutininbildung nach Anwendung kleiner Dosen. Wenn Endoxan vom 4. Tag nach Antigengabe in einer Konzentration von 0,5 bzw. 1,0 oder 2,0 mg/kg gegeben wird, so ist schon drei Tage später eine Dosis - abhängige Verminderung der Agglutinine im Serum festzustellen. Diese schnelle Manifestation der Schädigung weist darauf hin, daß Endoxan nicht nur die Induktion von Antikörper - bildenden Zellen hemmt, sondern auch die bereits stoffwechselaktiven, jungen und reifen Plasmazellen schädigt.

Auch Vincristin, ein Indol - Indolin - Derivat, und Vinblastin, ein Vincaleukoblastinsulfat, hemmen das Wachstum verschiedener lymphoider Neoplasmen und beeinflussen die Antikörperbildung. Nach Aisenberg (1) wird die Antikörperbildung vollständig unterdrückt : Ratten wurden mit Serumalbumin immunisiert. Vinblastin wurde 21 Tage lang, beginnend mit dem Tag der Immunisierung, intraperitoneal in einer Menge von 0,2 mg/kg/die gegeben, Vincristin in einer Dosierung von 0,025; 0,05; 0,1 und 0,2 mg/kg/die drei Tage lang nach Antigeninjektion, danach nur noch jeden 2. Tag, ebenfalls bis zum 21. Tag nach Immunisierung. Vincristin unterdrückte die Antikörperbildung vollkommen bei 0,1 und 0,2 mg/kg/die,

Vinblastin bei 0,2 mg/kg/die. Diese Ergebnisse sind insofern erwähnenswert, als diese Menge in relativ atoxischem Bereich liegt.

6) Antimetaboliten

Ebenso schwächen Antimetaboliten Immunreaktionen. Unter Antimetaboliten versteht man Substanzen, die strukturell einem für die Zelle notwendigen Baustoff entsprechen, biologisch jedoch als solche im Stoffwechsel inaktiv sind. Sterzl (66) fand unter den Purin- und Pyrimidin-Antagonisten zahlreiche Substanzen, die die Antikörperbildung hemmen. Als Antigen wurden neugeborenen Kaninchen isolierte Milzzellen eines normalen, nicht immunisierten Spenders, in vitro vermischt mit *Brucella suis*, gespritzt. Die Antimetaboliten wurden nach Antigeninjektion fünf Tage lang in verschiedenen Dosen verabfolgt.

a) Pyrimidin - Antagonisten

Von den Pyrimidin - Antagonisten blockierte 6-Azaguanin in einer leicht toxischen Dosis von 500,0 mg/g/die vollständig bei allen Tieren die Antikörperbildung, während eine Menge von 50,0 mg/g/die nur noch eine Unterdrückung bei einigen Tieren hervorrief; 5,0 mg/g/die erwiesen sich als wirkungslos. 6-Azathymin in einer Dosierung von 0,5 mg/g/die verursachte ebenfalls eine wesentliche Behinderung der Immunreaktionen gegenüber den Kontrolltieren.

b) Purin - Antagonisten

Unter den Purin - Antagonisten brachten 6-Thioguanine in einer Dosis von 0,1 und 0,05 mg/g/die einen totalen Block der Antikörperproduktion, während 8-Azaguanine, -1,0 mg/g/die -, wiederum eine wesentliche Unterdrückung bei einigen Tieren bewirkte.

c) Antagonisten des Nukleinsäurestoffwechsels

Antagonisten des Nukleinsäurestoffwechsels rufen **eben** = falls eine Hemmung der Antikörpersynthese hervor.

1) 6-Merkapto-Purin

6-Merkapto-Purin (6-MP) = Purinethol findet klinisch in einer Dosis von 2,5 mg/kg/die zur Behandlung der Leukämie Anwendung. Bei einer Dosis von 0,5 - 0,3 mg/g/die verhindert es immunologische Abwehrreaktionen. Die erste Dosierung lag nach Sterzl im toxischen Bereich. In einer früheren Arbeit zeigte Sterzl (67), daß 6-Merkapto-Purin während der induktiven **Phase** eingreift, in der Produktionsphase jedoch ohne Reaktion bleibt. Seine Wirkung beruht also auf dem Einfluß auf intrazelluläre, metabolische Prozesse während der induktiven Phase und nicht auf einem Eingreifen in die Zellmitose.

Die Antikörperproduktion wurde ebenfalls fast ganz unterdrückt, wenn Mäusen Schafzellen als Antigen appliziert wurden und 6-Merkapto-Purin an 4 aufeinanderfolgenden Tagen, beginnend mit dem Tag der Antigengabe,

intraperitoneal in einer Menge von 75 mg/g/die gegeben wurde. (43)

Die Bildung von präcipitierenden Antikörpern gegen Hämocyanin wurde, wie Mannick beschreibt (41), ebenfalls durch 6-MP unterdrückt. Schwartz und Dameshek (52) haben durch Verabfolgung von 6-MP an Versuchstieren nicht nur eine unspezifische Hemmung der humoralen Abwehrfunktionen erreicht, sondern auch im postnatalen Leben eine spezifische Toleranz gegen jenes Antigen ausgelöst, welches gleichzeitig mit diesem Antimetaboliten verabfolgt wurde. Diese spezifische Toleranz blieb bei Kaninchen gegen humanes Serumalbumin mindestens 80 Tage lang bestehen und war auch durch 2-malige Gabe des gleichen Antigens nicht zu durchbrechen. Mit dieser Zweit- und Dritt-Injektion gleichzeitig, also bereits nach Absetzen des 6-Mp's injiziertes bovines Gamma - Globulin löste die übliche Antikörperproduktion aus. Mecker und Mitarbeiter (42) untersuchten die Überlebenszeit von Haut - Homotransplantaten bei Kaninchen, die mit 6-MP behandelt waren. Sie betrug maximal 28 Tage. Die subcutane Verabfolgung von 6-MP in einer Dosierung von 12 mg/kg/die konnte die Überlebenszeit von Hauttransplantaten bei Kaninchen verdreifachen (61). Schwartz, Stack und Dameshek (59,60)

gaben erwachsenen Kaninchen 50 mg bovines Albumin i.m.
3 mal wöchentlich 2 Wochen lang und 6-MP in einer Menge
von 3 mg/kg/die

a) gleichzeitig mit dem Antigen in 7 - bzw. 21-tägiger
Fortsetzung,

b) 7 Tage vor bis 4 Tage nach der Antigeninjektion,

c) vom 18. bis 29. Tag nach Antigeninjektion.

Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt :

a) wird 6-MP g l e i c h z e i t i g mit dem Antigen
gegeben, so unterdrückt es die humoralen Abwehrmechanis-
men stark.

b) 6-MP v o r dem Antigen = Stimulus gegeben, zeigt
geringe Wirkung auf die Antikörperbildung.

c) 6-MP w ä h r e n d des höchsten Antikörpertiters
gegeben, ist vollkommen wirkungslos.

Schwartz, Eisner und Dameshek untersuchten die
Wirkung von 6-MP auf die Primär - und Sekundär - Reak-
tion. Unter Primär - Reaktion versteht man die immunolo-
gische Antwort auf einen erstmaligen Antigen - Kontakt.
Sie wird charakterisiert durch ein relativ langsames
Auftreten kleiner Antikörpermengen, - im Gegensatz zur
Sekundär - Reaktion, die nach einer Boosterung auftritt.
und in einem früheren Erscheinen großer Antikörpermengen
die längere Zeit im Blut nachweisbar bleiben, besteht.

Die Untersuchungen von Schwartz, Eisner und Jameshek machen deutlich, daß bei erwachsenen Kaninchen 6-MP in einer Menge von 6 mg/kg/die, - 14 Tage lang unmittelbar nach Antigeninjektion gegeben -, einen vollständigen Block der Primär - Reaktion gegenüber einer einmaligen i.v. Injektion von 20 mg humanen Serumalbumins hervorrief. Dosen von 1,2 und 3 mg/kg/die lassen eine lineare Beziehung zwischen Dosis und Wirkung erkennen. Für die Sekundär - Reaktion wurden bei der ersten Antigeninjektion 100 mg humanes Serumalbumin in einer einzigen, i.v. Injektion und 6 bis 12 Wochen später eine Reinjektion von 20 mg humanen Serumalbumins gegeben. 6-MP - 3 mg/kg/die 5 Tage lang und 6 mg/kg/die 8 Tage lang mit der Reinjektion des Antigens beginnend - konnte nur teilweise die Sekundär - Reaktion unterdrücken.

Andere Ergebnisse über die Wirkung von 6 - Merkapto - Purin auf die Sekundär - bzw. Tertiär - Reaktion beschreibt Schrae La Plante (58) : erwachsenen Kaninchen wurden für die Primär -, Sekundär- und Tertiär - Reaktion je 20 mg bovines Serumalbumin i.v. in Abständen von 30 bzw. 50 Tagen gegeben. 50 mg/kg/die 6-MP i.v. 10 Tage lang, beginnend mit dem Tag der Sekundär - Immunisierung, unterdrückten bei der Mehrzahl der Tiere die Antikörperbildung nicht. Auf den 3. Antigenreiz hin reagierten 2 von den 3 Versuchs -

tieren nicht mit einer Antikörperbildung. Die Frage besteht hier, ob eine spezifische immunologische Toleranz vorliegt.

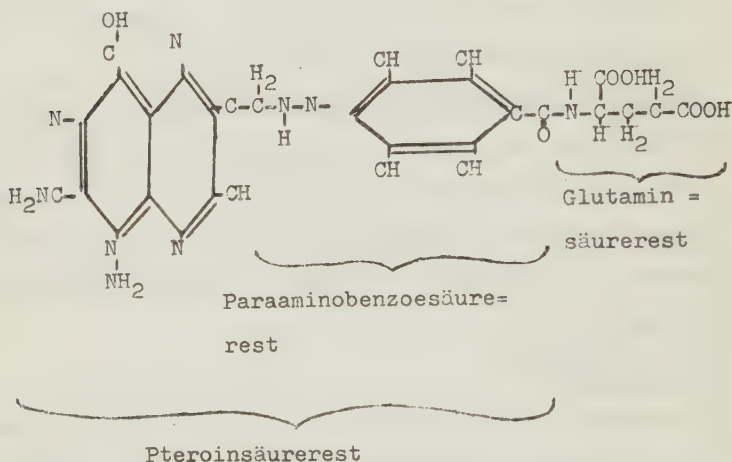
Die Wirkung von 6-MP kann noch um ein Vielfaches gesteigert werden, wenn es mit Duazomycin A, einem neuen Glutamin - Antagonisten, kombiniert wird (53).

Andere Metaboliten wurden hinsichtlich ihrer Beeinflussung der Überlebenszeit von Haut - Homotransplantaten untersucht. (52) Es zeigten sich bei 6 - Methyl - Merkapto - Purin, 5 - Fluoro - Uracil und Aminonukleosiden negative Ergebnisse. Ebenso blieb Stickstofflost ohne verlängernde Wirkung.

2) Methotrexat

Zu den Antimetaboliten, die zur Leukämiebehandlung verwendet werden, gehören auch die Folsäure - Antagonisten. Diese Beobachtung verdanken wir Farber und Mitarbeitern (16). Da die Umwandlung von Folsäure in deren aktive Form, die Folinsäure (= Citrovorumfaktor) bei der Nukleinsäuresynthese ein wesentlicher Schritt ist, und da maligne Zellen eine hohe Nukleinsäure - Umwandlungsrate haben, kann man therapeutisch einen künstlich induzierten Folsäuremangel ausnutzen. Die am meisten verwandten Mittel aus dieser Gruppe sind das Aminopterin (= Aminopteroylsäure) und das Amethopterin (= Methotrexat = 4 - Amino - N¹⁰ - methyl - pteroyl - glutaminsäure) .

Letzteres ist wegen seiner geringen Toxizität etwa zehnmal wirksamer als das Erstgenannte. Die Formel für Methotrexat lautet :



a) Seine Bedeutung als Cytostaticum

Außer seiner Wirkung als Antimetabolit gilt Methotrexat als Mitosegift; es unterbricht Teilungsprozesse in der Metaphase und bewirkt chromosomale Veränderungen. Es findet klinisch außer bei Leukämie, besonders im Kindesalter, (47) Anwendung bei Carcinom, Retikuloendotheliosen, Lupus erythematosus, Morbus Hodgkin, Lymphosarkom, Chorionepitheliom, bei primären und sekundären Hirntumoren, bei Mycosis fungoides und gelegentlich bei therapie - resistenter Psoriasis. Bei akuten

Leukosen konnte eine Überlebenszeit von gut einem Jahr (70) im Gegensatz zu unbehandelter Leukämie von nur 3 Monaten erreicht werden. (32, 47, 71) Remissionen treten bei Kindern in 40 - 68 % ein, bei Erwachsenen ist der Prozentsatz viel niedriger. Die Remissionen können verstärkt werden durch alternative Anwendung von Methotrexat und 6- Merkapto- Purin oder Steroiden. Methotrexat wird schnell vom Magen - Darmkanal resorbiert und relativ schnell im Urin ausgeschieden. Es hat einen langsamen und relativ unterschiedlichen Wirkungsbereich.

Nebenwirkungen der Therapie sind glatte, schmerzhaft Zunge, Erbrechen, Pharyngitis, Gastro - Enteritis, sowie Ulcerationen, Hautpigmentationen, makulo - papulöse Eruptionen, schütteres Haarkleid bis zur Alopezie; ferner wird über Infektanfälligkeit, Hepatitis mit Lebercirrhose und Knochenmarksaplasien mit Thrombopenie, aplastischer und megalocytärer Anämie, sowie Depressionen der Leukocyten, insbesondere der Segmentkernigen berichtet.

Cartwright (12) wies auf ein perniciosiformes Blutbild mit Pänhämocytopenie infolge eines durch Ernährung oder Medikamente bewirkten Folsäuremangels hin.

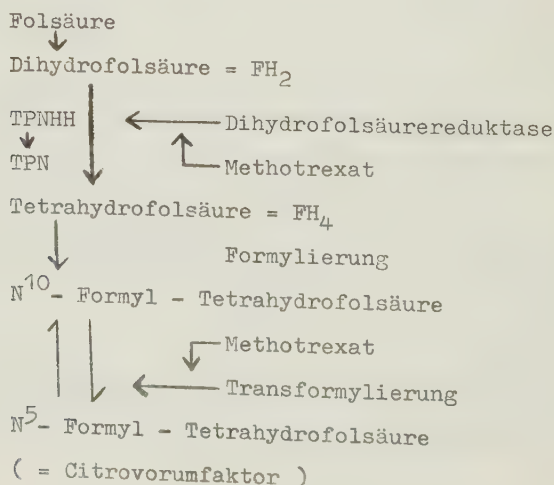
Untersuchungen an Ratten ergaben, daß Methotrexat, während der Schwangerschaft verabfolgt, zu Mißbildungen des Föten, wie Hydrocephalus, Hasenschar = ten oder zu Aborten führen kann. (9)

b) Biochemie

Methotrexat greift als Folsäure (= Pteroylglutamin = säure) - Antagonist in die Nukleinsäuresynthese ein.

Darauf beruht sein Einfluß auf metabolische und immuno-
logische Prozesse. Die Aspekte dieses Mechanismus wur-
den an Ratten, Rattenlebern, an Bakterien wie Strepto-
kokkus fäcalis und Laktobazillus - Arten demonstriert.
(8, 33, 45)

Sein Eingreifen in die Umwandlung von Folsäure in Fo-
linsäure wurde in vitro an leukämischen Zellen bei Mäu-
sen von Hutchison und Nichol (35, 44) erforscht. Os-
born und Mitarbeiter (48) zeigten, daß die Wirkung
von Methotrexat, welches durch geringe Abwandlung des
Folsäuremoleküls entsteht, auf der Blockade der Hy =
drierung der Folsäure und der Unterdrückung der Dihy =
drofolsäure - Reduktase beruht. Dieses Enzym kataly =
siert die an TPNH - gebundene Reduktion von Dihydrofol-
säure in Tetrahydrofolsäure. (78)



Es kommt so zu einer Hemmung der DNS - Synthese. Außerdem besorgt Methotrexat im Zellstoffwechsel die Übertragung von Ein - Kohlenstoff - Einheiten. Da diese auch beim Aufbau des Purinskelettes verwendet werden, wird durch die Folsäure - Antagonisten außerdem die Synthese der Purin - Nukleotide zu einem frühen Zeitpunkt gehemmt. (27, 28, 29, 38, 39, 51)

Über die Bedeutung der Nukleinsäuren bei der Antikörperbildung bestehen noch keine eindeutigen Vorstellungen. Möglicherweise spielen sie in der 1. Phase der Proteinsynthese, der Peptidsynthese, und in der durch Antigene beeinflussten 2. Phase, der Peptid - faltung, eine Rolle. (11, 22)

c) Sein Einfluß auf die Antikörperproduktion

Methotrexat reduziert sowohl humorale als auch zelluläre Abwehrreaktionen.

Uphoff (72) untersuchte erstmalig die unterdrückende Wirkung von Methotrexat auf Immunreaktionen. Es wurden hier bei 3 - 4 Monate alten Mäusen tödliche Ganzkörperbestrahlungen vorgenommen, homologes Knochenmark inokuliert und 14 Tage später Methotrexat in einer Dosis von 3 bzw. 1,5 mg/kg in 48-Stunden - Intervallen 5, 6 und 9 mal intraperitoneal verabfolgt. Dabei konnte festgestellt werden, daß eine beträchtlich hohe

Anzahl von Tieren diese Behandlung überlebte. Auffälligerweise reagierten weibliche Mäuse empfindlicher als männliche. Diese geschlechtsspezifische Toxizität wird auch von Goldin et al. (25) sowie von Uphoff in einer weiteren Arbeit bestätigt (73)

In der letztgenannten Arbeit untersuchte der Autor die Reaktion von Mäusen auf bovines Gamma - Globulin, tödliche Bestrahlungen und Impfungen mit genetisch inkompatiblem Knochenmark. Die Tiere zeigten keinerlei Abwehrreaktionen, wenn sie gleichzeitig mit Methotrexat behandelt wurden. Selbst Tumorzellen konnten bei der gleichen Methotrexat - Dosierung transplantiert werden.

Von 14 Mäusen, die 14 Tage lang mit diesem Medikament in therapeutischer Dosierung vorbehandelt waren, starb nur eine. Die besten Resultate ergaben sich bei schon geringtoxischen Dosen.

Im Vergleich zu 6-Merkapto-Purin hat Methotrexat eine etwas geringere Wirkung auf immunologische Abwehrmechanismen. (43) Goldin und Mitarbeiter stellten Untersuchungen an über den Einfluß von Methotrexat und seinen halogenierten Derivaten auf die Überlebenszeit von Mäusen, denen leukämische Zellen injiziert worden waren. (24) Letztere, noch wirksamer als das Methotrexat selbst, konnten die mittlere Überlebenszeit der Tiere wesentlich verlängern.

War die Anzahl der inokulierten, leukämischen Zellen klein, so unterdrückte Methotrexat ihr Wachstum in Milz, Leber und Lymphknoten. Die Leber bildete eine Art Methotrexat - Depot.(64)

Vergleichende Untersuchungen über die Einwirkung von Methotrexat und Melfalan, einer ebenfalls die Antikörperproduktion hemmenden, alkylierenden Substanz, wurden von Glynn und Mitarbeitern angestellt. (23) Die Vorbehandlung mit Methotrexat in einer Dosis von 0,75 mg/kg verlängerte die Überlebenszeit von Hauttransplantaten um 2 Tage.

Über den unterdrückenden Effekt dieses Medikamentes stellten Humphreys und Mitarbeiter (34) Beobachtungen an, die Uphoff erweiterte, indem er Mäuse gegenüber Tumoren empfänglicher machte. Dazu wurden den Tieren 2 oder mehr Wochen nach einer Methotrexatbehandlung Milz - und Thymuszellinjektionen transplantiert.(74)

Aus einer kürzlich erschienenen Arbeit (36) über Toleranzänderungen gegenüber Lungentransplantaten durch Behandlung mit Methotrexat geht hervor, daß die sonst zu beobachtende Reaktion mit schneller Abstoßung des Transplantates wesentlich schwächer und verzögert verläuft, wenn das Medikament in einer Dosis von 0,1 bis 0,125 mg/kg zweitägig in der ersten und 0,02 bzw. 0,03 mg /kg ab der zweiten Woche nach Transplantation

eines Lungenflügels gegeben wird.

Bei allen Autoren wird immer wieder auf die zeitliche Beziehung zwischen Antigen und Methotrexat hingewiesen. Wird das Mittel zu lange vor dem Antigen gegeben, so wird seine hemmende Wirkung auf die Antikörperbildung reduziert.

Nach Mecker und Mitarbeitern (42) hat Methotrexat in einer Dosis von 3 bis 6 mg/kg/die keinen Effekt auf die Bildung zellulärer Antikörper gegen Hauttransplantate bei Kaninchen, wenn das Methotrexat erst nach Anwachsen der Transplantate injiziert wird.

Ein Mißlingen der für Methotrexat spezifischen Unterdrückung der Antikörperbildung wurde von Brooke beobachtet. (7) Auch hier dienten erwachsene weiße Kaninchen als Versuchstiere. Ihnen wurden Schafererythrocyten, ein Hauttransplantat von einem farbigen Spendertier und bovines Gamma - Globulin appliziert. 1,5 mg/kg Methotrexat wurden jeden zweiten Tag einmal nur während der Woche, welche der Antigeninjektion und Transplantation vorausging, ein anderes Mal so lange, bis das Transplantat angewachsen war, injiziert. In jedem Falle wurden sowohl das Transplantat zu normaler Zeit abgestoßen, als auch zeitlich wie mengenmäßig normale Antikörper gefunden.

III) Eigene Fragestellung

Wir verwendeten in unseren Untersuchungen erwachsene Kaninchen und als Antigen artfremdes Eiweiß und zwar Rinderserumalbumin (BSA), Die Arbeit hatte zum Ziel, die Bildung von humoralen Antikörpern gegen BSA durch Methotrexat zu hemmen. Wir versuchten die Dosis zu finden, welche einen totalen Block der Immunreaktionen gegenüber einem erstmaligen Antigen - Reiz (= Primär - Reaktion) bewirkt. Ferner sollte auch der hemmende Einfluß dieser Methotrexatmenge auf die Antikörperbildung bei der Sekundär - Reaktion, d.h. bei nochmaligem Antigen - Kontakt (= Boosterung) geprüft werden.

B) Eigene Untersuchungen

I) Einfluß von Methotrexat auf Immunreaktionen

1) Material und Methoden

Antigen : Als Antigen wurde Rinderserumalbumin (BSA) "reinst" der Behringwerke A.G. verwandt, aus dem eine 5%ige, sterile Lösung hergestellt wurde.

Adjuvans : Dem Antigen wurde vor der Injektion eine Aluminiumhydroxydsuspension (Gel) in 1%iger (bezogen auf Al_2O_3) steriler Lösung im Verhältnis 4 + 1 zuge = setzt.

Tiere : Die Versuche wurden an erwachsenen Kaninchen beiderlei Geschlechts vorgenommen. Die Tiere wogen durchschnittlich 4 kg und hatten ein Durchschnitts = alter von einem halben Jahr.

Immunisierung : Wir prüften den Einfluß von Metho = trexat auf die Primär - und Sekundär - Reaktion. Für die Primär - Reaktion wurden 100 mg bovines Serum - Albumin und $Al(OH)_3$ und für die Sekundär - Reaktion (5 Wochen nach der Erstinjektion) an 4 aufeinander = folgenden Tagen Gaben von je 5, 10, 20 und 40 mg verab = folgt.

Wie wir im Vorversuch feststellten, ist die intravenöse Applikation von $Al(OH)_3$ unverträglich. Wir beobach = teten unmittelbar nach der i.v. Injektion von BSA + $Al(OH)_3$ den Exitus eines Kaninchens. Deshalb inji = zierten wir in die Glutsäalgegend BSA + $Al(OH)_3$ intramuskulär.

Immunologische Nachweismethoden : Die Blutentnahmen zum Antikörperrnachweis erfolgten jeweils 1 - 5 Wochen nach der Antigen - Injektion. Das Blut wurde der margi = nalen oder der in der Mitte des Ohres verlaufenden Vene entnommen, nachdem das Ohr zuvor zur besseren Durchblutung kräftig mit Xylol abgerieben worden war. Das Blut wurde zentrifugiert und in den beiden folgen = den Tests verwandt :

a) Ouchterlony - Test (49)

Dieser beruht auf einer spezifischen Eiweißfällungsreaktion. Diffundieren im Agar - Milieu Antigen und spezifische Antikörper aufeinander zu, so kommt es zu weißen Präcipitationslinien. (s. Abb. 1)

Der Test wird folgendermaßen angesetzt :

1,5 g Reinagar der Behringwerke A.G. werden mit 100 ccm Puffer, für den 4,445 g Na - Veronal (= Diäthylbarbitursäure) + 2,940 g Na - Acetat + 500 ccm aqua dest. mit 1 n HCl auf $p_{\text{H}} 8,2$ eingestellt werden, unter Zu = setzen einer Messerspitze Cialit im Wasserbad bis zum Klarwerden erhitzt, zentrifugiert und je 22 ml in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm gegossen. In das Zentrum der Platte wird nun mit einem Korkbohrer ein Loch mit einem Durchmesser von 4 mm gestanzt. Der Boden dieser Löcher wird jeweils mit einem kleinen Tropfen Agar - Lösung ausgegossen, damit die eingefüllten Flüssigkeiten nicht am Boden der Platte unter dem Agar wandern können. In das mittlere Loch wird das Antigen, hier BSA eingefüllt, bis eine Kuppe die Agar - Oberfläche überragt. Das entspricht im allgemeinen, je nach Größe des eingefüllten Agar - Tropfens, einer Menge von 0,04 ml. Die peripheren Löcher 1 - 6 werden in fallender Konzentration von 100 % bis 50 % mit

Kaninchenserum beschickt. (vgl. Abb. 1)

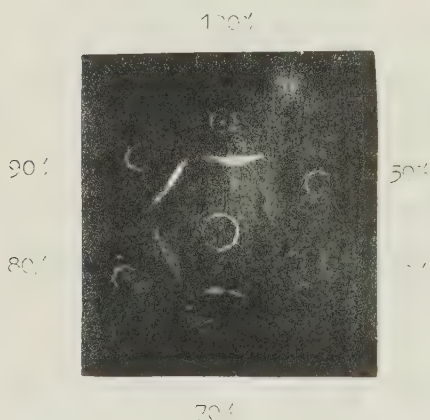


Abb. 1: Positiver Ouchterlony - Test

Die Flüssigkeiten diffundieren im allgemeinen inner = halb von 1 - 5 Tagen durch den Agar und precipitieren je nach Art und Stärke des Antigens an verschiedenen Stellen im Agar, hier meist zwischen dem BSA - und Serumloch, je nach Stärke der Antikörperbildung als schwache oder kräftige Linie im Agar.

b) B o y d e n - T e s t (6)

Hierbei handelt es sich um eine spezifische Reaktion mit quantitativer Aussage, bei der agglutinierende

Antikörper nachgewiesen werden. Hammelerythrocyten dienen als Trägersubstanz des Antigens. Bei Anwesenheit von Antikörpern gehen diese mit den mit Antigen beladenen Hammelerythrocyten eine Agglutination ein. Der Test wird folgendermaßen angesetzt :

α) Gewinnung von Hammelerythrocyten : Hammelblut (100 ml) wird in einer mit Glasperlen versehenen Flasche aufgefangen und so lange geschüttelt, bis das Blut erkaltet ist. Dieses Schüttelblut wird nunmehr 3 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, zentrifugiert und für eine Nacht bei $4 - 6^{\circ}$ im Kühl = schrank aufbewahrt.

β) Tanninbehandlung der gewaschenen Hammelerythrocyten: 5 ml gewaschener Hammelerythrocyten werden mit 17,5 ml physiologischer NaCl und tropfenweise mit 2,5 ml 0,1%iger frischer Tanninlösung versetzt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Sodann wird abzentrifugiert - 5 Minuten bei 3000 Umdrehungen / Min.- und 3 mal mit isotoner NaCl (2 - faches Volumen bezogen auf die Hammelerythrocyten - Ausgangsmenge) gewaschen und zentrifugiert. Das Erythrocytensediment wird dann mit NaCl auf 25 ml aufgefüllt.

γ) Behandlung der Tannin - behandelten Hammelerythrocyten mit Antigen : 1%iges Antigen wird durch eine Gaze filtriert und zunächst mit 1 / 10 Volumen gewaschener

nicht mit Tannin vorbehandelter Hammelerythrocyten voradsorbiert, abzentrifugiert und der klare Überstand von den Erythrocyten abgegossen. Hier wird die Kontrolle genau wie im Hauptversuch angesetzt.

Ein Teil der unter B) hergestellten Suspensionen von Tannin - behandelten Hammelerythrocyten wird nun mit einem Teil voradsorbierten Antigens 2 Stunden bei 37° inkubiert, zentrifugiert und 3 mal mit isotoner NaCl gewaschen. Die gemeinsame Ausgangsmenge wird auf das 10 - fache Volumen mit isotoner NaCl aufgefüllt.

N) Vorbehandlung der Antiseren : Vor der Verwendung im Test müssen die Antiseren jeweils 30 Minuten auf 56° im Wasserbad erhitzt werden und mit 1 / 10 Volumen an gewaschenen Hammelerythrocyten, die nicht Tannin - vorbehandelt sind, voradsorbiert werden. Dann wird 3 mal mit je 1 / 10 Volumen Hammelerythrocyten zentrifugiert, nicht geschüttelt, der Überstand mit einer Pipette abgehoben und weiterverarbeitet.

E) Zur Durchführung des Testes verwendet man mindestens 10 Röhrchen, in die je 0,5 ml NaCl gefüllt werden. In alle 1. Röhrchen jeder Versuchsreihe gibt man zusätzlich 0,5 ml Serum, welches zu einer geometrischen Reihe überpipettiert wird. Zu je 0,5 ml der Antiserumverdünungen werden 0,5 ml der, wie unter N) beschrieben, mit Antigen beladenen, Tannin - vorbehandelten Hammel =

erythrocytensuspension hinzugegeben, eine Stunde bei 37° inkubiert, aufgeschüttelt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Am folgenden Tag liest man die Hämagglutination durch Betrachten des Erythrocytensedimentes am Boden der Röhrchen am besten von unten ab. Bei positivem Ausfall des Testes, also bei eingetretener Hämagglutination, haben sich die Hammelerythrocyten am Boden des Röhrchens teppichartig ausgebreitet, während bei negativer Reaktion die Erythrocyten in den tiefsten Stellen der Röhrchenkuppen sedimentieren und nur eine eng begrenzte Zone des Röhrchenbodens ausfüllen.

2) Vorversuche zur Dosierung des Methotrexats mit Ergebnissen

Zunächst stellten wir Vorversuche über die Verträglichkeit von Methotrexat (*) bei Kaninchen an, da hierüber bei Versuchsbeginn noch keine Angaben vorlagen. Wir verwendeten dazu Tiere (Nr. A₇₀ 0♂, 308 ♀, 13 ♂ und 27 ♀), denen steigende Dosen 14 Tage lang verabreicht wurden. Als Kriterium für ein Ansprechen der Kaninchen auf diese Behandlung wurden die Leukocyten, das Differentialblutbild, das Gewicht und der äußere Aspekt herangezogen. Wir begannen mit einer Dosis von 0,05 mg/kg/die (Nr. A₇₀)

*Methotrexat wurde als amorphes, gelbes Pulver in Ampullen zu 5 mg und 50 mg von den Lederle Laboratorien American Cyanamid Company, Pearl River, New York in großzügiger Weise zur Verfügung gestellt, wofür wir hiermit vielmals danken möchten.

Da außer einer leichten Blutung an der rechten Hinter =
pfote und schütterem Haarkleid keine wesentlichen Ver =
änderungen beobachtet wurden, steigerten wir bald die
Dosis auf 0,1 mg/kg/die (Nr. 398 ♀). Bei diesem Tier
kam es am 3. Tag der Injektion zu starker Unruhe, ver =
mehrtem Schwitzen und schütterem Haarkleid. Außerdem
zeigten sich in den letzten beiden Tagen im peripheren
Blutbild 5 bzw. 3 Normoblasten; ferner bestanden Ani =
sopoikilocytose und Polychromasie. Die Veränderungen
im Differentialblutbild und Gewicht dieser beiden Tiere
sind aus Tabelle 1 zu ersehen.

Nr. A ₇₀	Leuk. mm ³	Lymp. in %	Segm. in %	Eos. in %	Bas. in %	Mon. in %	Gew. in kg
vor Inj. nach Inj.	7400	57	36	5		2	3,15
1. Tag	9300	47	44	8		1	
2. Tag	11200	43	57				
3. Tag	11300	74	26				
4. Tag	13200	66	29	2	2	1	
5. Tag	11100	95	5				
6. Tag	8300	77	23				
7. Tag	5600	76	22	1		1	
8. Tag	6200	60	20	19	1		
9. Tag	8200	60	13	26		1	
10. Tag	10600	71	22	7			
11. Tag	10400	69	19	12			
12. Tag	9800	59	20	19	1	1	
13. Tag	7900	65	28	7			
14. Tag	8400	76	20	4			3,535

Nr. 398	Leuk./ mm ³	Lymph. in %	Segm. in %	Eos. in %	Bas. in %	Mon. in %	Gew. in kg
vor Inj.	7900	43	53	3		1	4,5
nach Inj.							
1. Tag	8100	46	49	3	2		
2. Tag	19000	45	49	5	1		
3. Tag	16300	30	66	3		1	
4. Tag	14400	43	55	1		1	
5. Tag	13600	48	50	1		1	
6. Tag	15000	33	57	6		4	
7. Tag	15000	35	14	36		15	
8. Tag	18300	38	39	15		8	
9. Tag	21500	50	46	2		2	
10. Tag	11800	60	33	5		2	
11. Tag	17200	42	3	47	1	7	
12. Tag	12900	46	1	33	4	16	
13. Tag	16500	45	3	37	2	13	
14. Tag	9900	44	5	39	3	9	3,9

Tab. 1 : Leukocytenzahlen, Differentialblutbild und Gewicht im Verlaufe einer 14 - tägigen Methotrexatbehandlung mit 0,05 mg/kg/die (Nr. A₇₀ ♂) bzw.

0,1 mg/kg/die (Nr. 398 ♀).

Da in diesen Vorversuchen noch kein wesentlicher Unterschied in Blutbild und Körpergewicht vor und nach der Behandlung aufgetreten war, wählten wir als nächst höhere Dosen 0,5 mg/kg/die (Nr. 13 ♂) und 1,0 mg/kg/die (Nr. 27 ♀). Außer minimalen Veränderungen der

Leukocytenzahlen und der Gewichte, welche aus Tab. 2 ersichtlich sind, verhielten sich beide Tiere unauffällig.

Nr. 13 ♂	Leuk./ mm ³	Gewicht in kg	Nr. 27 ♀	Leuk./ mm ³	Gewicht in kg
vor Inj. nach Inj.	3300	4,5		7800	4,8
1. Tag	8500			8100	
2. Tag	8400			8900	
3. Tag	6900			8200	
4. Tag	6500			11300	
5. Tag	7500	4,25		9500	4,55
6. Tag	7300			6900	
7. Tag	7100			5000	
8. Tag	6300	4,5		5500	4,75
9. Tag	7500			8500	
10. Tag	7900			7800	
11. Tag	6900			7300	
12. Tag	6700			8600	
13. Tag	8700			9100	
14. Tag	8200	4,55		9300	4,55

Tab. 2 : Leukocytenzahlen und Gewicht im Verlaufe einer 14 - tägigen Methotrexatbehandlung mit 0,5 mg/kg/die (Nr. 13 ♂) bzw. 1,0 mg/kg/die (Nr. 27 ♀) .

Nach diesen Vorversuchen, aus denen ersichtlich ist, daß Kaninchen i.m. verabreichtes Methotrexat im Gegensatz zum Menschen bis 1,0 mg/kg/die ohne erkennbare

Leukopenie vertragen, begannen wir mit den Hauptversuchen.

3) Primär - Reaktion mit Ergebnissen

Wir untersuchten zunächst den hemmenden Einfluß von Methotrexat auf die Primär - Reaktion und verwandten dazu 13 Kaninchen. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde jedem Tier in einer einmaligen Injektion von 100 mg + Al (OH)₃ i.m. verabfolgt. Als Kontrolle, denen also nur das Antigen injiziert wurde, dienten die Kaninchen (Nr. 14 ♀ , 20 ♂ , 63 ♀ , 93 ♀ , 94 ♂ , 95 ♀ und 99 ♂). Die Versuchstiere erhielten zusätzlich steigende Dosen von Methotrexat i.m. und zwar 2 mg/kg/die (Nr. 22 ♀), 4 mg/kg/die (Nr. 25 ♀), 6 mg/kg/die (Nr. 16 ♀ und 19 ♂) und 12 mg/kg/die (Nr. 17 ♀ und 100 ♂). Diese Injektionen begannen gleichzeitig mit der Antigengabe und wurden 14 Tage lang fortgesetzt.

Auch unter dieser gegenüber dem Vorversuch gesteigerten Methotrexatdosierung stellten wir fest, daß kein wesentlicher leukopenischer Effekt und keine entscheidenden Veränderungen im Körpergewicht auftraten.

(vgl. dazu Tab. 3)

Lediglich bei den Dosen von 2 mg/kg/die (Nr. 22 ♀) und 4 mg/kg/die (Nr. 25 ♀) traten um den 7. Tag der Injektionen Diarrhoen auf, die auf dieses Medikament zurückgeführt werden können.

Versuchstiere :

	Leuk. in mm ⁴	Gew. in kg			Leuk. in mm ⁵	Gew. in kg
Nr. 22				Nr. 19		
vor Inj.	6300	3,6		vor Inj.	9400	4,0
7. Tag	8100	3,6		7. Tag	10500	4,0
14. Tag	6800	3,6		14. Tag	7400	3,95
Nr. 25				Nr. 17		
vor Inj.	8400	4,25		vor Inj.	8100	3,9
7. Tag	7400	4,1		7. Tag	6500	4,15
14. Tag	9000	3,9		14. Tag	8400	4,2
Nr. 16				Nr. 100		
vor Inj.	8900	4,2		vor Inj.	8700	3,85
7. Tag	9500	4,55		7. Tag	16200	4,15
14. Tag	9300	4,75		14. Tag	12000	4,3

Kontrolltiere :

Nr. 14				Nr. 94		
vor Inj.	8100	3,25		vor Inj.	6300	4,9
14. Tag	7800	3,2		14. Tag	9300	4,85
Nr. 20				Nr. 95		
vor Inj.	8400	4,2		vor Inj.	9800	4,65
14. Tag	8300	4,25		14. Tag	7700	4,65
Nr. 63				Nr. 99		
vor Inj.	8800	3,8		vor Inj.	8500	4,35
14. Tag	7600	3,85		14. Tag	7300	4,2
Nr. 93						
vor Inj.	7500	5,2				
14. Tag	8500	5,2				

Tab. 3 : Leukocytenzahlen und Gewichte der Versuchs -
und Kontrolltiere bei der Primär - Reaktion .

Im Hinblick auf die Abwehrmechanismen traten jedoch unter der Methotrexatbehandlung Veränderungen auf. Die Prüfung auf Antikörper im Boyden - bzw. Ouchterlony - Test ergab eine quantitative Abhängigkeit von der Methotrexatdosis. Die Antikörperbildung gegenüber 100 mg BSA + Adjuvans war bei dem mit 2 mg/kg/die (Nr. 22) bzw. 4 mg/kg/die (Nr. 25) Methotrexat 14 Tage lang behandelten Kaninchen im Vergleich zur Kontrolle (Nr. 20) herabgesetzt. Es zeigte sich also eine Beeinträchtigung der Immunreaktionen, die zwar noch nicht erheblich, jedoch eindeutig erkennbar war. Über Zeitpunkt und Stärke der Antikörperbildung geben die Tabellen 4a,b; 5a,b; und 6a, b nähere Hinweise.

Verdünnungen	1:2	:4	:8	:16	1:32	:64
14. Tag	+++	+++	+++	++	+	-
21. Tag	+	-	-	-	-	-
28. Tag	+	-	-	-	-	-
38. Tag	-	-	-	-	-	-

Tab. 4a : Boyden - Test vom Kontrolltier (Nr. 20 ♂)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	50 %
7. Tag	++	+	+	-	-
14. Tag	++++	+++	++	+	-
21. Tag	++	+	-	-	-
28. Tag	+	-	-	-	-

Tab. 4 b: Ouchterlony - Test vom Kontrolltier (Nr.20 ♂)

Verdünnungen	1:2	:4	:8	:16	:32
14. Tag	++	+	+	+	-
21. Tag	+	-	-	-	-
28. Tag	+	-	-	-	-
38. Tag	-	-	-	-	-

Tab. 5a : Boyden - Test mit der Methotrexatdosis von 2 mg/kg/die (Nr. 22 ♀)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	
7. Tag	+	+	+	-	
14. Tag	+++	++	+	-	
21. Tag	++	+	-	-	
28. Tag	-	-	-	-	

Tab. 5 b : Ouchterlony - Test mit der Methotrexat =
dosis von 2 mg/kg/die (Nr. 22 ♀)

Verdünnungen	1:2	:4	:8	
14. Tag	+	-	-	
21. Tag	+	+	-	
28. Tag	+	+	-	
38. Tag	-	-	-	

Tab. 6 a : Boyden - Test mit der Methotrexatdosis
von 4 mg/kg/die (Nr. 25 ♀)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %
7. Tag	+	+	+	-	-
14. Tag	++	+	+	-	-
21. Tag	+	+	+	+	-
28. Tag	+	+	-	-	-

Tab. 6 b : Ouchterlony - Test mit der Methotrexat =
dosis von 4 mg/kg/die (Nr. 25 ♀)

Da trotz dieser Methotrexatdosen die Antikörperbildung zwar abgeschwächt, aber nicht vollkommen unterdrückt wurde, erhöhten wir bei zwei Versuchstieren (Nr. 16 ♀ + 19 ♂) die Injektionen des Antimetaboliten auf 6 mg/kg/die. Diese wurden wiederum im Anschluß an die einmalige Injektion von 100 mg BSA + Al (OH)₃ 14 Tage

lang verabfolgt. Kontrolltier war Nr. 14 ♀, es erhielt nur Antigen + Adjuvans. Es ergab sich eine weitere Dosis - abhängige Verminderung der Antikörperbildung. Von den 2 Versuchstieren bildete eines (Nr. 16 ♀) überhaupt keine Antikörper mehr. Das zweite Versuchstier (Nr. 19 ♂) bildete zwar noch Antikörper, jedoch waren , im Vergleich zur Kontrolle und zu den mit geringeren Methotrexatmengen behandelten Tieren (vgl. Tab. 7 und 8), die Abwehrmechanismen reduziert. Auffallend war bei diesen Tieren , daß die Ergebnisse im Boyden - Test von denen im Ouchterlony - Test abwichen. Der Nachweis von agglutinierenden Antikörpern fiel bei Kontrolle und Versuchstieren am 7. und 21. Tag negativ aus. Einzelheiten über die Bildung präzipitierender Antikörper können den Tabellen 7 und 8 entnommen werden.

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %
7. Tag	-	-	-	-	-
14. Tag	-	-	-	-	-
21. Tag	+++	++	+	+	-
28. Tag	-	-	-	-	-

Tab. 7 : Ouchterlony - Test vom Kontrolltier
(Nr. 14 ♀)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	
7. Tag	-	-	-	-	
14. Tag	-	-	-	-	
21. Tag	++	+	+	-	
28. Tag	-	-	-	-	

Tab. 8 : Ouchterlony - Test mit der Methotrexatdosis von 6 mg/kg/die (Nr. 19 ♂)

Da auch bei einer Dosierung von 6 mg/kg/die Methotrexat noch Antikörper gegenüber bovinem Serumalbumin nachweisbar waren, erhöhten wir die Antimetabolitdosis bei zwei weiteren Versuchstieren (Nr. 17 ♀ und Nr. 100 ♂) auf je 12 mg/kg/die Methotrexat. Die Kontrolltiere (Nr. 63 ♀, 93 ♀, 94 ♂, 95 ♀ und 99 ♂) erhielten wie die Versuchstiere wiederum nur BSA und Adjuvans.

Bei allen 5 Kontrollen waren am 14. Tag erstmals präzipitierende Antikörper nachweisbar; Einzelheiten über ihre Stärke und Dauer sind den Tab. 9 - 13 zu entnehmen. Der Boyden - Test zeigte hingegen am 14. und 21. Tag keine Antikörper.

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	
7. Tag	-	-	-	-	
14. Tag	++	+	+	-	
21. Tag	+++	++	+	-	
28. Tag	++	+	-	-	
31. Tag	-	-	-	-	

Tab. 9 : Ouchterlony - Test vom Kontrolltier (Nr. 630)
♀

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	50 %
7. Tag	-	-	-	-	-
14. Tag	+++	++	+	+	-
21. Tag	++	++	+	+	-
28. Tag	+	+	-	-	-
31. Tag	-	-	-	-	-

Tab. 10 : Ouchterlony - Test vom Kontrolltier (Nr. 93)
♀

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	50 %
7. Tag	-	-	-	-	-
14. Tag	++++	+++	++	+	+
21. Tag	+++	++	+	+	-
28. Tag	++	+	+	-	-
31. Tag	+	+	+	-	-
35. Tag	-	-	-	-	-

Tab. 11 : Ouchterlony - Test vom Kontrolltier (Nr. 94)
♂

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %
7. Tag	-	-	-	-	-
14. Tag	++++	+++	++	+	+
21. Tag	+++	++	+	+	-
28. Tag	++	+	+	+	-
31. Tag	-	-	-	-	-

Tab. 12: Ouchterlony - Test vom Kontrolltier (Nr. 95 ♀)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %
7. Tag	-	-	-	-	-
14. Tag	+++	++	+	-	-
21. Tag	++++	+++	++	+	-
28. Tag	+++	-	-	-	-
31. Tag	-	-	-	-	-

Tab. 13: Ouchterlony - Test vom Kontrolltier (Nr. 99 ♂)

Die entscheidenden Ergebnisse erzielten wir bei den Versuchstieren Nr. 17 ♀ und Nr. 100 ♂, welche Methotrexat in einer Dosierung von 12 mg/kg/die bekommen hatten. Wie aus Tab. 14 hervorgeht, führt diese über 14 Tage durchgeführte Methotrexatbehandlung zu einer vollständigen Unterdrückung der Antikörperbildung.

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %
7. Tag	-	-	-	-	-
14. Tag	-	-	-	-	-
21. Tag	-	-	-	-	-
28. Tag	-	-	-	-	-
31. Tag	-	-	-	-	-

Tab. 14 : Ouchterlony - Test mit der Methotrexat =
dosis von 12 mg/kg/die (Nr. 17 ♀ und Nr. 100 ♂)

4) Sekundär ± Reaktion mit Ergebnissen

Nachdem wir einen totalen Block der Immunreaktionen durch Methotrexat bei der Primär - Reaktion erzielt hatten, prüften wir die Sekundär - Reaktion, bei der bekanntlich vermehrt und beschleunigt Antikörper gebildet werden. Wir verwandten dazu die Tiere 63, 93, 17, 100, 94, 95, 99 weiter, da wir nach den verabreichten Antigen - Injektionen (100 mg BSA) jetzt die Boostering anschließen konnten. Dazu wurde das Antigen an 4 aufeinander folgenden Tagen in steigenden Dosen von 5, 10, 20 und 40 mg injiziert, und Methotrexat den beiden Tieren Nr. 63 ♀ und Nr. 93 ♀ in einer Dosierung von 12 mg/kg/die über 14 Tage verabfolgt. (s. Abb. 2)

**Zeitliche Angaben über Antigen-(↓) und Antimetabolit-(→) Gaben
bei Primär- und Sekundärreaktion**

Tier Nr.

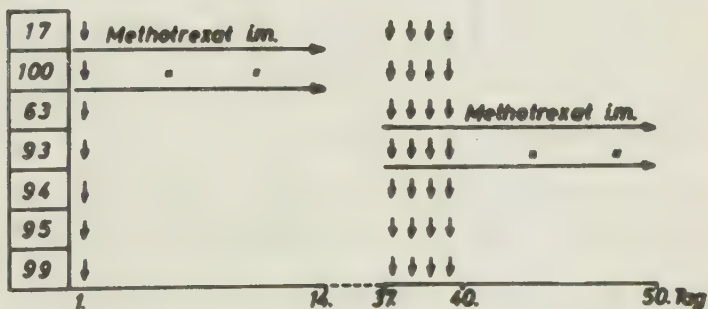


Abb. 2 : Grafische Darstellung der zeitlichen Verhältnisse zur Erzeugung einer Primär - (1. - 14. Tag) und Sekundär - Reaktion (1. - 50. Tag)

Die wiederholten Gaben von Methotrexat wurden von beiden Tieren gut vertragen. Die Ergebnisse sind in Tab.15 zusammengefaßt.

Nr. 63	Leuk. in mm ³	Gew. in kg		Nr. 93	Leuk./ in mm ³	Gew. in kg
vor Inj.	7900	3,8		vor Inj.	7800	4,9
7. Tag	8800	3,7		7. Tag	7500	4,7
14. Tag	8100	3,7		14. Tag	7600	4,7

Tab. 15 : Leukocytenzahlen und Gewichte der Versuchs =
tiere der Sekundär - Reaktion

Die Antikörperbildung trat bei der Sekundär - Reaktion wie erwartet früher und verstärkt auf: die BSA - Antikörper waren bei den Versuchstieren bis zum 21. Tag, bei den Kontrollen teilweise bis zum 40. Tag im Serum nachweisbar. Auch die mit 12 mg/kg/die Methotrexat im Anschluß an die Boosterung 14 Tage lang behandelten Kaninchen (Nr. 63 ♀ und 93 ♀) waren immunologisch aktiv. Die Abwehrreaktionen waren jedoch im Vergleich zu den Kontrollen abgeschwächt. Die Tiere, welche in der Primär - Reaktion Methotrexat (Nr. 17 ♀ und 100 ♂) jedoch für die Sekundär - Reaktion nur Antigen - Re = injektionen bekommen hatten, zeigten ebenfalls noch verminderte Antikörperbildung. Immunreaktionen waren hier bis zum 14. bzw. 28. Tag nachweisbar, die Titer waren im Verhältnis zu den nur mit Antigen behandelten

Tieren (Nr. 94, 95 und 99) ebenfalls niedriger.
(vgl. Tab. 16 - 24)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %	
7. Tag	++	+	+	-	-	
14. Tag	+++	++	+	+	+	
21. Tag	+++	++	+	+	-	
28. Tag	-	-	-	-	-	

Tab. 16 : Ouchterlony - Test mit der Methotrexatdosis
von 12 mg/kg/die (Nr. 63 ♀)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %	50 %
7. Tag	++	+	+	-	-	-
14. Tag	++++	+++	++	+	+	-
21. Tag	+	+	-	-	-	-
28. Tag	-	-	-	-	-	-

Tab. 17 : Ouchterlony - Test mit der Methotrexatdosis
von 12 mg/kg/die (Nr. 93 ♀)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	50 %	
7. Tag	++	+	-	-	-	
14. Tag	+++	++	+	-	-	
21. Tag	-	-	-	-	-	

Tab. 18 : Ouchterlony - Test von Nr. 17 ♀ (= Versuchs-
tier der Primär - und Kontrolle der Sekundär - Reaktion)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %	50 %
7. Tag	++++	+++	++	+	+	+
14. Tag	++++	+++	++	+	+	+
21. Tag	+++	++	+	+	+	+
28. Tag	++	+	+	+	+	+
40. Tag	-	-	-	-	-	-

Tab. 19 : Ouchterlony - Test von Nr. 100 ♂ (= Versuchs-
tier der Primär - und Kontrolle der Sekundär - Reaktion)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %	50 %
7. Tag	++++++	+++++	++++	+++	++	+
14. Tag	++++++	+++++	++++	+++	++	+
21. Tag	+++++	++++	+++	++	+	+
28. Tag	++++	+++	++	+	+	+
40. Tag	+++	++	+	+	+	+
43. Tag	-	-	-	-	-	-

Tab. 20 : Ouchterlony - Test vom Kontrolltier (Nr. 94 ♂)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %	50 %
7. Tag	++++++	+++++	++++	+++	++	+
14. Tag	++++++	+++++	++++	+++	++	+
21. Tag	+++++	++++	+++	++	+	+
28. Tag	++++	+++	++	+	+	+
40. Tag	-	-	-	-	-	-

Tab. 21 : Ouchterlony - Test vom Kontrolltier (Nr. 95 ♀)

Serum	100 %	90 %	80 %	70 %	60 %	50 %
7. Tag	++++++	+++++	++++	+++	++	+
14. Tag	++++++	+++++	++++	+++	++	+
21. Tag	+++++	++++	+++	++	+	+
28. Tag	++++	+++	++	+	+	+
40. Tag	++++	+++	++	+	+	+
43. Tag	-	-	-	-	-	-

Tab. 22: Ouchterlony - Test vom Kontrolltier (Nr. 99 ♂)

Im Ouchterlony - Test traten an aufeinander folgenden Tagen doppelte, teilweise auch dreifache Linien auf. Deshalb wurde das BSA-immunoelektrophoretisch auf " Reinheit " geprüft, und es wurden verschiedene Fraktionen gefunden, auf die diese mehrfachen Präcipitationen zurückzuführen sind. - In einem Ouchterlony - Gegenversuch fanden wir diese Annahme bestätigt. Wir konnten mit einer höheren Antigenmenge die durch die Subfraktionen hervorgerufenen Linien unterdrücken.

Im Boyden - Test war der Antikörper - Titer erst am 24. Tag am höchsten, jedoch fanden wir bei den Tieren Nr. 63, 93, 17 und 100 trotz der hohen Antigen - Dosierung eine durch Methotrexat bedingte reduzierte Antikörperbildung. (vgl. Tab. 23 und 24)

Verdünnungen	1:2	:4	:8	:16			
Nr. 17	-	-	-	-			
Nr. 100	-	-	-	-			
Nr. 63	++	+	+	-			
Nr. 93	-	-	-	-			
Nr. 94	+++	+	++	-			
Nr. 95	++	+	+	-			
Nr. 99	++	++	-	-			

Tab. 23 : Boyden - Test von allen Tieren der Sekundär -
Reaktion mit Serum vom 14. Tag.

Verdünnungen	1:2	:4	:8	:16	:32	:64	:128	:256	:512	:1024
Nr. 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nr. 100	++	++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
Nr. 63	+++	+++	++	++	+++	+++	++	+	-	-
Nr. 93	+	++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
Nr. 94	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Nr. 95	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	++	-
Nr. 99	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-

Tab. 24 : Boyden - Test von allen Tieren der Sekundär -
Reaktion mit Serum vom 24. Tag.

II) Diskussion der Ergebnisse

1) Einfluß des Methotrexats auf Blutbild, Gewicht und Körperhaare

Die unter der Methotrexatbehandlung auftretenden Veränderungen des peripheren Blutbildes (3) äußern sich in einer Reduktion der Leukocytenzahlen und der Zellen der weißen Vorstufen. Außerdem soll es zu einem Anstieg der Neutrophilen mit relativer Vermehrung der Eosinophilen kommen.

Wir fanden, daß nach 14 - tägiger Injektion von je 0,05 bis 12,0 mg/kg/die Methotrexat die Leukocytenzahlen etwa auf der gleichen Höhe blieben wie vor den Injektionen. (vgl. Tab. 1, 2, 3 und 15) Auch Zählungen 14 Tage nach der letzten Methotrexatinjektion ergaben, im Gegensatz zum Menschen, keine wesentliche Depression der weißen Blutkörperchen. Die Werte schwankten zwischen 5 600 und 21 500 / mm³.

Die physiologischen Leukocytenwerte bei Kaninchen werden unterschiedlich angegeben. In der Literatur sind Werte zwischen 6 000 und 13 000 / mm³ beschrieben; (2) Friedrich (21) nennt Werte von $9\,660 \pm 20\%$, Vedder (75) solche zwischen 2 350 und 27 600 / mm³.

Wir möchten also Schermer (55) zustimmen, daß das

Kaninchen in Bezug auf sein Blutbild ein äußerst labiles Tier ist.

Daher können die Leukocytenzahlen nicht als Kriterium für eine Wirksamkeit der Methotrexatbehandlung angesehen werden. Bestätigt werden konnte von uns eine relative Vermehrung der Eosinophilen. Außerdem wurden ein Ansteigen der Monocytenzahlen (vgl. Tab. 1), sowie Blutungen, wahrscheinlich Ausdruck einer Thrombopenie, beobachtet.

In Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur zeigten sich im peripheren Blutaussstrich Normoblasten und typische basophile Verfärbungen der Erythrocyten; ferner fanden wir eine Anisopoikilocytose und Polychromasie.

Die Gewichtsbewegung der mit Methotrexat behandelten Tiere ergab keine wesentlichen Veränderungen gegenüber den Kontrollen. (vgl. Tab. 1, 2, 3 und 15) Möglicherweise besteht bei Kaninchen eine für Methotrexat erhöhte Toleranz. Der Gewichtsverlust, welcher beim Menschen unter der Methotrexat - Therapie aufzutreten pflegt, dürfte auch hier nur indirekt mit dem Medikament in Zusammenhang stehen, da es sich stets um malignom - kranke Patienten handelt.

Als toxische Methotrexatnebenwirkung fanden wir ein schütteres Haarkleid; das Fell wurde struppig, später

fielen die Haare büschelweise aus.

2) Blockierte Antikörperbildung bei der Primär - Reaktion

Unsere immunologischen Voruntersuchungen bestätigten die Tatsache, daß nach einer einmaligen Antigen - Injektion (100 mg BSA + Adjuvans) Antikörper um den 7. Tag auftreten und nach 4 Wochen wieder aus dem Serum verschwinden.

Bei einer Dosis von 2 und 4 mg/kg/die Methotrexat, welche 14 Tage lang im Anschluß an die Antigen - Injektion verabfolgt wurde, war die Antikörperbildung bereits reduziert. Die Immunreaktionen waren im Vergleich zur Kontrolle vermindert. (vgl. Tab. 4 - 6) Bei Dosen von 6 und 12 mg/kg/die Methotrexat konnte eine dosis - abhängige Beziehung zwischen Methotrexat und der Unterdrückung der Antikörperbildung verzeichnet werden. Von den beiden mit 6 mg/kg/die Methotrexat behandelten Versuchstieren reagierte eines (Nr. 13) nur sehr schwach positiv, (vgl. Tab. 8) während der Antikörpernachweis bei dem anderen Kaninchen (Nr. 16) vollkommen negativ war.

Dieser Befund ist auf Grund der einmaligen Injektion einer großen Antigenmenge der einleitend erwähnten Immunparalyse nach Felton (17) ähnlich, kann jedoch

damit nicht gleichgestellt werden, da Cinader und Mitarbeiter (13) den Beweis erbrachten, daß eine Immun = paralysie mit Protein - Antigenen nicht zu erzeugen ist. Dixon und Maurer (1953 und 1955) bestätigten diese Tatsache, indem sie große Dosen von BSA, - 18 g/kg 6 Wochen lang -, erwachsenen Kaninchen injizierten: 4 von 5 Versuchstieren bildeten Antikörper auf BSA.

In unserer letzten Versuchsserie war auffal = lend, daß die Ergebnisse im Boyden - und Ouchterlony - Test unterschiedlich ausfielen. Die Ursache hierfür kann in dem verschiedenen Angriffspunkt der beiden Nachweismethoden liegen. Der Ouchterlony - Test weist präcipitierende, der Boyden - Test agglutinierende Antikörper nach.

Die Dosis von 12 mg/kg/die Methotrexat brachte die entscheidenden Ergebnisse: Die Kontrolltiere zeigten positive Antikörperrnachweise, während die beiden (Nr. 17 und 100) mit Methotrexat behandelten Tiere einen totalen Block der Antikörperproduktion aufwiesen.

Über den hemmenden Einfluß von Methotrexat auf die Bildung h u m o r a l e r Antikörper liegen mehrere Beobachtungen vor. (25, 73, 74)

Literaturangaben über die Wirkung von Metho = trexat auf die Bildung z e l l u l ä r e r Antikör = per widersprechen einander teilweise.

Einleitend wurden Untersuchungen beschrieben, in denen trotz Methotrexatgaben zelluläre Antikörper gegen Transplantate gebildet werden. (8) Demgegenüber beobachteten Jane und Mitarbeiter trotz Methotrexatbehandlung keine Toleranzveränderungen gegenüber Lungentransplantaten. (36).

Eigene Untersuchungen über diese gegensätzlichen Ergebnisse liegen nicht vor. Die Klärung dieser Frage wäre jedoch von allgemein medizinischer Bedeutung, vor allem im Hinblick auf die Therapie der Autoaggressionskrankheiten.

3) Reduzierte Antikörperbildung bei der Sekundär -

Reaktion

Kontroll - und Versuchstiere, die zur Sekundär - Reaktion verwendet wurden, erhielten an vier aufeinander folgenden Tagen steigende Dosen von 5 - 40 mg. BSA. Die Versuchstiere (Nr. 63 und 33) erhielten außerdem erneut über 14 Tage je 12 mg/kg/die Methotrexat. Bekanntlich werden nach einer Boosterung Antikörper vermehrt und beschleunigt gebildet; so ist es nicht verwunderlich, daß bei allen Tieren, den Kontroll - und Versuchstieren, der Antikörpernachweis im Boyden - und Ouchterlongy - Test positiv ausfiel. (vgl. Tab. 16 - 24)

Die Versuchstiere der Sekundär - Reaktion (Nr. 63 und 33) zeigten ebenso wie die Versuchstiere der

Primär - Reaktion (Nr. 17 und 100) im Vergleich zu den Kontrollen wiederum eine quantitative Abhängigkeit der Antikörperbildung insofern, als die Titerhöhen reduziert waren. (vgl. Tab. 18, 19, 23, 24) Die bei der Primär - Reaktion mit 12 mg/kg/die Methotrexat behandelten Kaninchen, die nach dem ersten Antigen - Reiz keine Antikörper gebildet hatten, (Nr. 17 und 100) bildeten nach Antigen - Reinjektion ohne erneute Methotrexatgaben jetzt auch Antikörper, wenn auch vermindert. Die teilweise Unterdrückung der Immunreaktionen durch Methotrexat in der Sekundär - Reaktion bestätigt den totalen Block der Antikörperbildung in der Primär - Reaktion.

Eine Erklärung dafür, daß die in der Primär - Reaktion mit 12 mg/kg/die Methotrexat behandelten Tiere bei der Sekundär - Reaktion auch noch mit reduzierter Antikörperbildung reagierten, geben die Arbeiten von Fountain und Mitarbeitern. (19, 20) Sie fanden bei ihren Versuchen an Mäusen, daß Methotrexat in solchen Geweben angereichert wird, welche normalerweise Fol - und Folsäure enthalten, z.B. Leber und Milz. Konzentrationen von Methotrexat konnten dort noch längere Zeit nach der Therapie nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen unsere bei Kaninchen durchge =
führten Untersuchungen, daß mit Gaben von 12 mg/kg/die
Methotrexat Immunreaktionen auf bovines Serumalbumin
unterdrückt werden können, ohne daß bei den Tieren
toxische Medikamentschäden nachweisbar waren.

Die klinisch - therapeutische Bedeutung,
die sich aus der Möglichkeit ergibt, Immunprozesse zu
reduzieren, ist vorläufig noch nicht abzusehen. Man
kann durch die Unterdrückung der Antikörperbildung un =
erwünschte immunologische Reaktionen dämpfen. Dadurch
bekommt man ein Mittel in die Hand, beispielsweise in
der plastischen Chirurgie bei Haut- und Knochenmarks =
übertragungen oder in der Mikrobiologie, eine Toleranz
zu erzeugen.

Unsere Untersuchungen sollten zur Anregung weiterer
Studien dienen. Vorerst ist es beim Menschen noch nicht
möglich, aus diesen Ergebnissen praktisch - therapeu =
tische Konsequenzen zu ziehen.

C) Zusammenfassung

Die manchmal wünschenswerte Unterdrückung von Antikörpern ist beim Menschen ohne Gefahren vorerst noch nicht sicher möglich. Im Tierversuch liegen darüber mehrere Mitteilungen vor, worüber einleitend berichtet wird.

Wir prüften an erwachsenen Kaninchen, ob ein totaler Block der Antikörperbildung gegenüber Rinder - Serumalbumin (BSA) durch Methotrexat, einem Folsäure - Antagonisten, zu erzielen ist.

Vorversuche an vier Tieren galten der Methotrexatdosierung. Leukocytenzahlen, Differentialblutbild, Gewicht und Haarveränderungen waren Kriterium für ein Ansprechen auf den Antimetaboliten. Im Gegensatz zum Menschen wurden bei Kaninchen die Leukocytenzahlen auch bei hoher Dosierung (12 mg/kg/die) nicht wesentlich unterdrückt; dagegen zeigten sich Veränderungen im Differentialblutbild, in dem auch kernhaltige Erythrocyten nachweisbar waren.

Im Hauptversuch prüften wir an 13 Kaninchen den hemmenden Einfluß von Methotrexat auf die Antikörperbildung bei der Primär - Reaktion, d.h. der immunologischen Antwort auf einen e r s t m a l i g e n Antigenkontakt. Dazu injizierten wir in einer einmaligen Gabe 100 mg bovines Serumalbumin (BSA) und Aluminiumhydroxydgel als Adjuvans in einem Verhältnis von 4 + 1

intramuskulär. Gleichzeitig wurde eine Behandlung mit je 4, 8 und 12 mg/kg/die Methotrexat i.m. begonnen und insgesamt 14 Tage lang durchgeführt. Zum Nachweis humoraler Antikörper verwendeten wir den Hämagglutinationstest nach Boyden und den Geldiffusionstest nach Ouchterlony.

Wir fanden mit steigenden Methotrexatgaben eine reduzierte Antikörperbildung. Bei einer Dosis von 12 mg/kg/die wurden die immunologischen Abwehrmechanismen vollständig unterdrückt.

Eine zweite Versuchsreihe galt der Sekundär - Reaktion, d.h. dem Booster - Effekt. Als Erstinjektion wurden wiederum 100 mg BSA + Adjuvans im Verhältnis 4 + 1, als Reinjektion an 4 aufeinander folgenden Tagen 5, 10, 20 und 40 mg BSA + Adjuvans verabfolgt. Gleichzeitig mit der ersten Antigen - Reinjektion gaben wir über 14 Tage eine Methotrexatmenge von 12 mg/kg/die, welche bei der Primär - Reaktion einen totalen Block der Abwehrmechanismen bewirkt hatte. Diese Dosis konnte jedoch hier die Immunreaktionen nur unvollständig unterdrücken.

Inwieweit diese Ergebnisse für die Behandlung von Immunkrankheiten beim Menschen Bedeutung haben, muß vorerst noch offen bleiben.

Literaturverzeichnis

- 1) Aisenberg, A.C., Nature, 200, 4905, 484 (1963)
- 2) Albritton, E.C., Verlag W.B. Saunders, Comp.,
Philadelphia und London (1955)
- 3) Anton, A.H., Nichol, C.A., Proc. Amer. Ass.
Cancer Res. 2, 91 (1956)
- 4) Arnold, H., Bourseaux, F., Brock, N., Arzneimittel-
Forsch. 11, 143 (1961)
- 5) Benjamin, E., Sluka, E., Wien. klin. Wschr. 21,
311 (1908)
- 6) Boyden, S.V., J. exp. Med. 93, 107 (1951)
- 7) Brooke, M.S., Plast. reconstr. Surg. 26, 4,
453 (1960)
- 8) Broquist, H.P., Kohler, A.R., Hutchison, D.J.,
Burchenal, J.H., J.biol. Chem., 202, 59, (1953)
- 9) Buchar, F. Inaugural - Dissert., Leipzig (1956)
- 10) Burnet, F.M., Fenner, F.J., Prod. Antibod.,
Melbourne (1949)
- 11) Campbell, D.H., Garvey, J.S., Int. Arch. Allergy,
12, 70 (1958)
- 12) Cartwright, G.E., Tatting, B., Ashenbrucker, H.,
Wintrobe, M.M., Blood, 4, 301 (1949)
- 13) Cinader, B., Dubert, J.M., Proc. roy. Soc. Med.
(London), 146, 18 (1957)

- 14) Condit, P.T., Proc. Amer. Ass. Cancer Res.
2, 194, (1957)
- 15) Condit, P.T., Eliel, L.P., J. Amer. Med. Ass.,
172, 451 (1960)
- 16) Farber, S., Cutler, E.C., Hawkins, J.W., Harrison,
J.H., Peirce, E.C., Lenz, G.G., Sci., 106,
619 (1947)
- 17) Felton, L.D., J. Immunol., 61, 107 (1949)
- 18) Ferguson, F.C., Thiersch, J.B., Philips, F.S.,
J. Pharmacol. exp. Ther., 98, 293 (1950)
- 19) Fountain, J.R., Waring, G.B., Hutchison, D.J.,
Burchenal, J.H., Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)
81, 193 (1952)
- 20) Fountain, J.R., Hutchison, D.J., Waring, G.B.,
Burchenal, J.H., Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)
83, 369 (1953)
- 21) Friedrich, L., Folia haemat., 73, 49 (1955)
- 22) Garvey, J.S., Campbell, D.H., J. exp. Med. 107,
497 (1958)
- 23) Glynn, J.P., Bianco, A.R., Goldin, A., Nature
198, 4884, 1003 (1963)
- 24) Goldin, A., Humphreys, S.R., Venditti, J.M.,
Mantel, N., J. nat. Cancer Inst. 22, 811 (1959)
- 25) Goldin, A., Greenspan, E.M., Schoenback, E.B.,
Cancer, 3, 849 (1950)

- 26) Goldin, A., et al. J. nat. Cancer Inst. 17,
203, (1956)
- 27) Goldthwait, D.A., Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)
86, 842 (1954)
- 28) Goldthwait, D.A., Bendich, A., J. biol. Chem.
196, 841 (1952)
- 29) Greenberg, G.R., Fed. Proc. 13, 745 (1954)
- 30) Haurowitz, F. herausgeg. Pappenheimer, A.M.,
Columbia Univ. Press. Theories of Antibody -
Response (N.Y.) (1953)
- 31) Haurowitz, F., Acad. Press. Inc. (N.Y.) 289 (1950)
- 32) Haut, A., Altmann, S.J., Wintrobe, M.M., Cartwright,
G.E., Blood, 14, 828 (1959)
- 33) Hendlin, D., Koditscheck, L.K., Soars, M.H.,
J. Bact., 65, 466 (1953)
- 34) Humphreys, S.R., Chirigos, M.A., Milstead, K.L.,
Mantel, N., Goldin, A.J. Nat. Cancer Inst. 27,
259 (1961)
- 35) Hutchison, D.J., Dowling, M.T., Burchenal, J.H.,
Proc. Amer. Ass. Cancer Res, 1, 22 (1954)
- 36) Jane, C.S., Perrin, M.D., Maurer, A.M., Sterling,
T.D., Pediatrics, 31, 833 (1963)
- 37) Kaplan, M.H., Coons, A.H., Deane, H.W., J. exp.
Med. 91, 15 (1950)
- 38) Kritzler, R.A., Amer. J. Med., 25, 532 (1958)

- 39) Liss, E., " Wissen und Praxis ", 37 (1964)
- 40) Maguire, H.C., Maibach, H.I., Minisee, L.W.,
Allergy, 32, 406 (1961)
- 41) Mannick, J.A., Ann. Acad. Sci. (N.Y.) 99, 3,
762 (1962)
- 42) Mecker, W.R., Condie, R.M., Good, R.A., Varco, R.L.,
Ann. Acad. Sci. (N.Y.) 87, 1, 203 (1960)
- 43) Nathan, H.C., Bieber, J., Elion, G.B., Hitchings,
G.H., Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 107, 796 (1961)
- 44) Nichol, C.A., Cancer Res., 14, 522 (1954)
- 45) Nichol, C.A., Zakrzewski, S.F., Welch, A.D.,
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 83, 272 (1953)
- 46) Oehme, J., Mschr. Kinderheilk., 11, 299 (1963)
- 47) Oehme, J., Janssen, W., Hagitte, Ch., Georg Thieme,
Leipzig, " Leukämie im Kindesalter " (1958)
- 48) Osborn, M.J., Freeman, M.V., Huennekens, F.M.,
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 97, 429 (1958)
- 49) Ouchterlony, Ö., Acta path. mikrobiol. scand. 25,
186 (1948)
- 50) Pauling, L., Bull. Soc. Chim. biol., 30, 247 (1948)
- 51) Plaut, G.W.E., Bethel, J.J., Lardy, H.A., J. biol.
Chem. 184, 795 (1950)
- 52) Mc Quarrie, D.G., Condie, R.M., Mecker, W.R.,
Roller, F.R., Varco, R.L., Proc. soc. exp. Biol.
(N.Y.) , 103 (1960)
- 53) Rosenberg, S., Calabresi, P., Nature, 199, 4898,
1101 (1963)

- 54) Scheiffarth, F., Berg, G., Legler, F., Schuler, E.,
Arzneimittel - Forsch. 7, 360 (1957)
- 55) Schermer, B., Verl. Johann Ambrosius Barth, Leipzig
" Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere "(1958)
- 56) Schmidt, S., C. R. Soc. Biol. (Paris), 106,
765 (1931)
- 57) Schmidt, S., C. R. Soc. Biol. (Paris)
110, 1126 (1932)
- 58) Schrae La Plante, E., Condie, R.M., Good, R.A.,
J. Lab. clin. Med. 59, 4, 542 (1962)
- 59) Schwartz, R., Stack, J., Dameshek, W.,
Clin. Invest. 38, 1394 (1959)
- 60) Schwartz, R., Stack, J., Dameshek, W.,
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 99, 164 (1958)
- 61) Schwartz, R., Dameshek, W., Donovan, J.,
J. clin. Invest. 39, 6, 952 (1960)
- 62) Schwartz, R., Dameshek, W., Nature, 183, 1682
(1959)
- 63) Schwartz, R., Eisner, A., Dameshek, W.,
J. clin. Invest. 38, 8, 1394 (1959)
- 64) Skipper, H.E., Schabel, F.M., Bell, M., Thomson,
J.R., Johnson, S., Cancer Res., 17, 717, (1957)
- 65) Stender, H.S., Strauch, D., Winter, H.,
Strahlentherapie 115, 2, 175 (1961)

- 66) Sterzl, J., Nature, 189, 1022 (1961)
- 67) Sterzl, J., Nature, 185, 256 (1960)
- 68) Taliaferro, W.H., Taliaferro, L.G., J. Immunol.,
66, 181, (1951)
- 69) Taliaferro, W.H., Taliaferro, L.G., Janssen, E.F.,
J. Infekt. Dis. 91, 105, (1952)
- 70) Tivey, H., Ann. Acad. Sci. (N.Y.) 60, 322 (1954)
- 71) Tuuteri, I., Donner, M., Wegelius, R.,
Ann. Paediat. Fenn., 5, 39, (1959)
- 72) Uphoff, D.E., Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)
99, 651, (1958)
- 73) Uphoff, D.E., Plast. reconstr. Surg., 28, 110 (1961)
- 74) Uphoff, D.E., Transplant. Bull. 28, 12, (1961)
- 75) Vedder, A., Z. ges. exp. Med., 73, 402, (1930)
- 76) Venditti, J.M., Humphreys, S.R., Goldin, A.,
Cancer Res. 19, 986 (1959)
- 77) Venditti, J.M., Humphreys, S.R., Goldin, A.,
Cancer Chemother. Rep., 3 (1959)
- 78) Wilmanns, W., Klin. Wschr. 39, 884, (1961)
- 79) Wilmanns, W., Klin. Wschr. 40, 533 (1962)
- 80) Woodruff, M.F.A., Ann. Acad. Sci. (N.Y.)
64, 792 (1957)
- 81) Woodruff, M.F.A., Klin. Wschr. 36, 245 (1958)

Herrn Professor Dr. med. J. Oehme danke ich
für die freundliche Überlassung des Themas ,
die jederzeit gewährte Unterstützung und die
Durchsicht dieser Arbeit .

Lebenslauf

Am 27.6.1937 wurde ich als 2. Kind des Sonderschul =
rektors Hermann Bachmann und seiner Frau Gertrud geb.
Rieper in Wesel / Niederrhein geboren. In Kleinbünzow /
Pommern trat ich 1943 in die Volksschule ein, später
besuchte ich die Volksschulen in Wesel und Obersuhl /
Rotenburg / F., wohin wir nach der Zerstörung meiner
Heimatstadt verschlagen wurden. 1947 bestand ich die
Aufnahmeprüfung für das naturwissenschaftliche Gymnasi =
um in Rotenburg / F. Nach der Rücksiedlung meiner El =
tern nach Wesel besuchte ich das dortige neusprachli =
che Gymnasium, wo ich 1957 das Abitur bestand.

Für das Sommersemester 1957 schrieb ich
mich an der Medizinischen Fakultät in Marburg / L. ein.
Mein 2. - 6. Semester studierte ich in Kiel; dort be =
stand ich im Winter - Semester 1959/60 das Physikum.
Die übrigen klinischen Semester war ich wieder an der
Marburger Universität immatrikuliert. Dort legte ich
im Sommer - Semester 1963 das Medizinische Staats =
examen ab (15.8.1963)

Meine akademischen Lehrer waren :

In Marburg die Herren Professoren :

Dimroth, Petry, Pirson, Seidel, Walcher.

Berendes, Bock, Braun - Falco, Exner,
Förster, Gedigk, Hartmann, Huber,
Jakobs, Linneweh, Niessing, Oehme,
Prinz, Schmid, Schwaiger, Siegert,
Straub.

In Kiel die Herren Professoren :

Bargmann, Horstmann, Kleinfeller,
Lochte - Holtgrewe, Lullies, Netter,
Gärtner, Phillip, Reinwein.

